

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 00258740 B1
(43)Date of publication of application: 15.03.2000

(21)Application number: 980015971
(22)Date of filing: 04.05.1998

(71)Applicant: CHEIL JEDANG CORPORATION
(72)Inventor: JIN, GI HONG
KIM, HYEONG SEOK
LEE, HYEON HWAN
LEE, SEON GI
NOH, HYEON MO

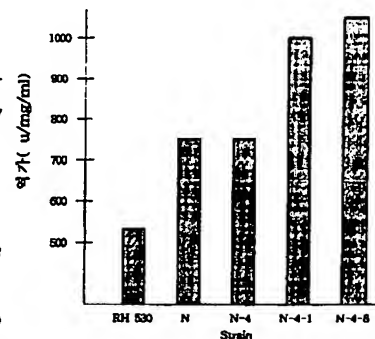
(51)Int. Cl. C12N 1/20

(54) VIBRIO METSCHNIKOVII RH530 N-4-8 (KFCC-11030) PRODUCING PROTEASE TO DISSOLVE DETERGENT AND METHOD FOR MANUFACTURING THE SAME

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided is *Vibrio metschnikovii* RH530 N-4-8 (KFCC-11030) which has high sensitivity to LAS and high protease activity to manufacture the protease in a high yield from the strain.

CONSTITUTION: *Vibrio metschnikovii* RH530 N-4-8 (KFCC-11030) is obtained by the following steps of: i) selecting strains which are resistant or highly sensitive to surfactants like AOS or LAS; ii) subculturing the strains three or four times to select strain L12-15 showing high stability; and iii) cultivating the strain L12-15 at various conditions in order for the strain to have superior protease activity. Wherein, pH ranging from 8 to 9 is appropriate and salinity is 0.4-0.8%. And nitrogen source is required. The medium is added with 2% of WGM and 1% of CGM.



COPYRIGHT 2001 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (19980504)
Final disposal of an application (registration)
Date of final disposal of an application (20000229)
Patent registration number (1002587400000)
Date of registration (20000315)

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶ (11) 공개번호 특 1999-0084319
C12N 1/20 (43) 공개일자 1999년 12월 06일

(21) 출원번호 10-1998-0015971
(22) 출원일자 1998년 05월 04일
(71) 출원인 제일제당 주식회사 손경식
서울특별시 중구 남대문로 5가 500번지
(72) 발명자 진기홍
인천광역시 중구 신흥동 3가 51-1
김형석
인천광역시 중구 신흥동 3가 51-1
이현환
서울특별시 동대문구 이문동 270
노현모
서울특별시 관악구 신림동
이선기
인천광역시 중구 신흥동 3가 51-1
(74) 대리인 최학현, 황주영

심사청구 : 있음

(54) 세탁세제용 단백질 분해 효소의 생산 균주 및 그 효소의 제조방법

요약

본 발명은 LAS에 높은 민감성을 보이며 단백질 분해효소의 활성이 높은 균주 비브리오 메쉬니코우이 알 에이취 530 엔-4-8 및 이 균주를 이용하여 세탁세제용 단백질 분해효소를 고수율로 제조하는 개선된 방법에 관한 것이다.

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 NTG에 의해 1차적 돌연변이를 거쳐 선별된 돌연변이주 2차, 3차 돌연변이 처리한 후 계면활성제에 대한 내성이나 높은 민감성을 보이는 균주를 선별하였을 때의 역가 향상을 보여주는 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명의 목적은 새로운 미생물을 개발하여 세제첨가용 효소로서 가장 많이 사용되는 알칼리성 단백질 분해효소의 생산성을 향상시키는데 있다.

단백질분해효소가 세제에 첨가되어 사용되기 위해서는 몇 가지 특징적 성질을 가져야 한다. 첫째, 세탁 세제의 주원료인 음이온 계면활성제에 저해를 받지 말아야 하고, 둘째, 대부분의 세탁세제의 pH 영역인 알칼리조건에서 활성이 유지되고 장기간 보존 안정성이 있어야 하며, 셋째, 작용온도의 범위가 넓어야 한다. 즉, 낮은 온도에서나 높은 온도에서나 활성이 유지되어야 한다.

현재 미국이나 유럽에서의 세탁온도 조건은 40℃ 내지 50℃에서 수행되는 고온형이며 한국을 포함한 동남아 및 개도국의 세탁 조건은 실온인 20℃ 내지 30℃이므로 저온에서 활성이 좋은 알칼리성 단백질 분해효소를 생산하는 균주의 분리 동정이 매우 중요하다고 할 수 있다.

기존의 세탁세제용 단백질 분해효소 중에 저온활성형이라고 시판하고 있는 효소는 NOVO사의 사비나제(Savinase)와 Genencor사의 프로페라제(Properase) 등이 나와 있으나 이들 제품은 실질적으로

실온(20℃)에서의 효소 활성이 최적온도

(55℃)의 활성에 비하여 15% 수준으로 매우 낮다.

이러한 문제들을 극복하기 위하여 미국특허 제5340735호 및 미국특허 제5399283호에는 기존의 효소로부터 부위 특이적 돌연변이(site specific mutagenesis)를 이용하여 보다 우수한 기능을 가진 단백질 분해 효소를 개발하였다고 명시하고 있으며, EP 0337009 A2나 JP 257775 등에는 자연계로부터 상기 요건을 갖는 균주들을 탐색하여 산업화하고자 시도하고 있다. 그러나, 상기 특허들은 생산 효율 및 생산 설비 등의 미비로 실제적으로 제품화하여 시판되지 못하고 있다.

이러한 현 실정에서, 본 발명자들은 저온 활성이 상대적으로 우수하고 음이온 계면활성제인 SDS에 높은 저항성을 가진 균주를 자연계로부터 분리 동정하여 이미 특허출원(대한민국 특허공개번호 96-007772)한 바 있고 이 균주를 산업화하기 위하여 생산성이 획기적으로 향상된 균주를 선별하는 방법을 확립하였다.

일반적으로 미생물이 생산하는 최종산물의 생산성 향상을 위한 균주 개량은 크게 두 가지로 나누어 볼 수 있다. 그 첫번째가 화학적 돌연변이원을 처리하여 균주를 인위적으로 변이시켜 적절한 선별배지에서 원하는 균주를 스크리닝하는 것이고 또 하나는 관련된 유전자를 동정하고 적절한 생산강화 시스템을 보강하여 생산성을 향상시키는 방법이다. 여기서, 생산강화 시스템이란 강력한 프로모터나 시그널 서열 등을 구조 유전자와 결합시켜 모주에 다시 도입함으로써 생산성을 높이는 것을 말한다.

통상 자연계에서 특수 기능을 가진 물질을 생산하는 균주를 분리 동정하더라도 그 생산성이 매우 낮기 때문에 위에서 설명한 절차를 거쳐 그 산업적 가능성을 높게 된다. 균주 개량의 요체는 적절한 돌연변이원의 선정, 선별배지의 조건, 역가 향상 균주의 안정화가 무엇보다 중요하다. 이 중에서 빠른 시간 내에, 효과적으로 생산성이 향상된 균주를 얻기 위해서는 초기 균주 선별 배지를 어떻게 조성하느냐가 관건이 된다.

예를 들면, EP 0337009 A2에는 세제용 섬유질 분해효소를 생산하는 미생물 바실러스(Bacillus)를 자연계에서 분리 동정하고, 셀룰라제의 생산성을 높이기 위해 세포막 투과 시스템의 변이를 유도해서 생산성이 증대된 균주를 선별하였다고 보고 하였다. 이때, 선별 배지에 세포막 합성 저해제인 반코마이신, 리스토세틴(Ristocetin) 같은 약제를 첨가하여, 이 약제에 내성이 있는 균주를 선별함으로써 셀룰라제의 생산성을 높였다고 명시하고 있다.

본 발명에서는 알칼리성 단백질 분해효소가 여러 세정제나 계면활성제 등과 함께 사용된다는 점과, 계면활성제가 여러 균주들의 세포막이나 세포벽에 작용한다는 사실에 착안하여 NTG와 같은 강한 돌연변이원을 처리한 후 이들 균을 강력한 음이온 계면활성제인 LAS(직쇄 알킬벤젠 설포네이트: Linear Alkylbenzen Sulfonate)나 AOS(알파-올레핀 설포네이트: α -Olefin Sulfonate)에 내성이 있거나, 적절한 농도의 LAS나 AOS에 높은 민감성을 보이는 균주를 선별함으로써, 생산성이 향상되는 독창적인 방법을 사용하였다. 본 발명에서 시험 대상으로 한 균주 개량의 모주는 이미 대한민국 특허공개번호 96-007772에 명시된 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530 (*Vibrio metschnikovii* RH530)으로서 그람 음성균에 속한다. 일반적으로, 그람 음성균은 그람 양성균과는 달리 세포막외에 외막(outer membrane)이 있으며 이 사이에 특징적인 원형질층(periplasmic space)이 존재한다. 또한, 세포막에는 펩티도글리칸이라는 층이 그람 양성균과 그람 음성균에 공통으로 존재한다. 즉, 그람 음성균의 세포막 구조는 그람 양성균보다 약간 더 복잡하며, 따라서, 세포내에서 합성된 대사산물이 세포외에 분비되기 위해서는 그람 양성균보다 더 많은 투과 경로를 거쳐야 한다.

그러므로, 본 발명은 이러한 그람 음성균의 세포막 구조 및 지질 합성에 영향을 줄 수 있는 성분인 음이온 계면활성제에 의한 막 구조 변화에 초점을 맞추었으며, 음이온 계면활성제는 대부분의 세탁세제에 주원료로 사용되는 LAS 또는 AOS를 사용하였다.

이러한 음이온 계면활성제를 우수 균주 선별의 지표로 할 경우 세포막에 영향을 줄 수 있는 균주 선별이 가능하며, 음이온 계면활성제에 저항성이 있는 단백질 분해효소만 과도하게 분비하는 균주를 선별하는 이중적 효과를 기대할 수 있다. 즉, LAS 또는 AOS에 내성을 가지는 균주를 선별할 경우 세포막의 투과성 변화가 초래될 수 있으며 LAS나 AOS에 저항성이 있는 단백질 분해효소 생산균만 선별할 수 있다.

반면에 LAS나 AOS에 민감한 균주를 선별한 경우 주 단백질 분해효소의 선별가능성은 줄어 들지만, 세포막의 구조가 덜 조밀해지거나 느슨한 막 구조로 전환되어 막투과성이 증대된 균주 선별이 가능하다.

발명이 이루고자하는 기술적 과제

본 발명은 화학적 돌연변이원인 N,N-니트로소구아니딘(nitrosoguanidine) (NTG)을 모주인 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530에 처리하고, 선별배지로 적정 농도의 LAS나 AOS가 첨가된 배지에서 성장하지 못하는 민감성 균주나 적정농도 이상에서 성장하는 내성 균주를 선별함으로써 세포막 투과성이 초래된 균주를 선별, 이들 중에서 단백질분해 효소의 생산성이 증대된 균주를 찾는 방법 및 그 균주에 관한 것이다.

한편, 본 발명에 사용한 출발 균주로서 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530 균주에서 생산되는 단백질 분해효소는 기술원된 대한민국 특허공개 번호 96-007772에서 명시한 바와 같이 계면활성제의 일종인 SDS와 LAS에 대한 내성이 뛰어나고, pH범위가 8~11 정도인 알칼리조건에서 역가가 고르게 잘 나타나며, 비교적 넓은 온도범위에서 그 활성을 유지하여 최적의 역가를 보이는 60℃ 고온에서의 효소역가도 높을 뿐 아니라 40℃ 정도의 중온이나 그 이하 저온에서의 역가도 NOV0 사의 사비나제(Savinase)와 비교할 때 비교적 높은 활성을 보인다. 이러한 특징으로 본 균주에서 생산되는 알칼리성 단백질 분해효소는 세탁세제에 사용되기에 매우 좋은 조건을 갖추고 있으며 따라서 이들 균주의 최적 배양조건을 찾아 알칼리성 단백질 분해효소의 대량생산 체제를 갖추고자 하는 것이 또한 본 발명의 목적이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 LAS에 높은 민감성을 보이며 단백질 분해효소의 활성이 높은 신규한 균주 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530 엔-4-8을 제공한다.

본 발명의 성공적인 수행을 위하여 몇 가지의 사전에 필요한 분석을 먼저 수행하였는데 그것은 본 발명에서 사용되는 SDS, 우레아-저항성 단백질 분해효소생산균주인 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530(Vibrio metschnikovii RH 530, KCTC 00888P)을 모주로 하여 화학적 돌연변이원인 NTG에 대한 생장곡선의 작성 및 농도별 민감도 작성 등이다.

또한, 본 발명에서 역가 측정을 위한 균주의 배양은 표1에 명시하며, 배양은 30℃에서 24시간 동안 왕복진탕기(reciprocal shaker)에서 하였다.

[표 1]

LSC 육즙조성

성분명	함량
박토 트립톤	1%
효모추출액	0.5%
염화나트륨	1%
탄산나트륨	2%

다른 양태로서, 본 발명은 상기의 방법으로 얻은 신규한 균주 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530 엔-4-8을 본 발명의 특정 조건하에서 배양하고 배양물로부터 단백질 분해효소를 분리함을 특징으로 하여 상기 단백질 분해효소를 제조하는 방법을 제공한다.

본 발명에서 최적의 배양조건을 찾는 실험은 크게 두 가지 단계로 실시하였다. 기존에 알려진 비브리오 균주의 생리적 특징과 일반적인 박테리아 배양에 많이 쓰이는 조건들을 적절히 적용하여 모균주인 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530의 최적 생산조건을 우선 확립하였고, 이를 기본으로 돌연변이 균주인 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 RH 530 엔-4-8의 최적 생산배지 조건을 결정하였다.

모든 실험에서 사용한 알칼리성 단백질 분해효소의 역가측정 방법은 1981년 Long이 발표한 논문(J.Gen.Microbiol., 127, 193-199)에 실린 방법을 실제 세척조건에 가깝도록 변형하여 사용하였다. 효소 기질로는 합성 기질인 아조카세인을 사용하였다. 우선, 효소가 첨가되어있지 않은 세척세제를 표준 사용권장량(0.50~0.70g/ℓ)만큼 증류수에 녹이고 여기에 아조카세인을 2% 되도록 넣어 용해시킨다. 이 기질용액의 pH는 9~10 사이이다. 기질이 잘 용해되면 1ml씩 분주하여 40℃에서 20~30분간 가온하고 적절히 희석한 효소용액 1ml과 섞어준다. 혼합후 40℃에서 30분간 반응시키고 10% TCA 용액을 2ml을 넣은 뒤 4℃에서 10분 정도 두어 반응하지 않고 남은 단백질을 침전시킨다. 이것을 원심 분리하여 상등액을 취하고 0.5N NaOH 용액과 1:1로 혼합하여 잘 섞어준 뒤 440nm에서 흡광도를 측정한다. 효소역가 1 유니트는 위의 실험에서 마지막 혼합액의 흡광도 값이 0.1 상승하는 것으로 하였다. 따라서 효소역가의 계산 식은 다음과 같다:

$$\text{유니트} = \frac{(\text{시료의 흡광도}) - (\text{무효소용액의 흡광도})}{0.1} \times \text{시료의 희석비율}$$

가. 배지의 염도와 pH 조건 설정

비브리오 균주는 해양성 미생물로서 알칼리 조건에서 성장이 잘 되며 또한 최소한의 염분이 성장에 꼭 필요하다고 알려져 있다. 따라서, 배지의 pH와 염분농도를 결정하는 실험을 실시하였다.

모균주를 최초로 동정했던 배지는 토양으로부터 균주선별을 위해 강한 염기성조건(pH 10.5)을 가진 배지였으므로 그와 기본 조성을 같이하며 여러 가지의 pH를 가진 배지를 만들어 균을 배양하고 이때 생산된 단백질 분해효소의 역가를 측정하였다. 그 결과 모균주와 돌연변이 주에서 모두 약알칼리 조건(pH 8~9)에서의 효소생산역가가 가장 높은 것으로 밝혀졌다.

또한, 동상 Vibrio 균주의 성장에는 반드시 Na^+ 이온이 필요하다고 알려져 있으므로 적절한 Na^+ 이온의 농도를 찾는 실험을 실시하였고, 그 결과 최적 생장조건과 최고의 효소역가를 보이는 염분농도가 차이를 나타내는 것을 밝혀졌다. 이에 본 균주의 배양조건은 최고의 효소 생산성을 보이는 염분농도로 결정하였다.

이러한 실험 결과들은 일차적으로는 최초의 균주동정 배지에 적용되는 결과이지만 이후 연속되는 최적배지 결정 실험에서도 각각의 원료들에 대해서 같은 방법으로 실험을 하여 최적 pH와 염분농도를 결정하였다.

나. 여러 가지 영양 원들의 선택과 최적화

일반적으로 미생물을 키우는 배지의 구성은 탄소원과 질소원, 그리고 염과 기타 첨가물 등으로 크게 나누어 생각할 수 있다. 이들의 종류와 조합, 그리고 농도 결정에 따라 미생물의 생장정도와 생산되는 부산물의 양과 성질이 좌우된다. 따라서, 본 실험에서는 모균주인 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530 균주와 돌연변이주인 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530 엔-4-8 균주에 맞는 최적배지 조성을 모두 연구하였으며, 이는 플라스크 수준에서의 균주 배양뿐 아니라 대용량 발효 수준에서의 균주 배양에도 적용되

는 것이다.

일반적으로 미생물 배양에 사용되는 탄소원으로는 글루코즈, 수크로즈, 전분등의 단일 물질로 이루어진 순수 탄수화물이나 또는 곡물(cereal grain), 맥아, 쌀등이 함유된 복합 탄수화물을 사용한다. 본 발명에서도 탄소원으로 몇 가지 물질을 사용하였으며 이때 함량은 글루코즈를 기준으로 0~10% 사이를 조사하였다. 그러나, 모주인 비브리오 메쉬니코우비 알에이취 530 균주에서는 알칼리성 단백질 분해효소의 생성이 글루코즈 억제를 받음이 확인되었고 이는 다른 종의 비브리오 균주에서도 이미 보고된 바가 있다(J.Gen.Microbiol., 127, 193-199, 1981). 따라서, 알칼리성 단백질 분해효소를 다량 얻고자 하는 본 발명 목적에 위배되므로 이후의 배지조성에는 탄소원을 첨가하지 않았다.

다음으로 미생물 배양에 사용되는 질소원으로는 크게 유기질소원과 무기질소원으로 나눌 수 있는데 무기질소원으로는 NO_3^- 와 암모늄 이온 물질이 있다. 하지만 본 발명에 사용한 비브리오 메쉬니코우비 균주는 NO_3^- 를 NO_2^- 로 환원시키지 못하는 특징이 있으므로 무기질소원으로는 암모늄 이온만을 조사하였다. 유기질소원은 종류가 매우 다양한데 일반적으로 대두밀, 튜너 추출물, 옥수수 침지액, 소맥 글루텐 밀, 옥수수 글루텐 밀, 목화씨분말, 카세인등이 사용된다. 본 발명에서도 이들을 단독, 혹은 배합하여 여러 가지 배지를 만들고 균주를 배양하였으며 효소역가를 측정하여 최적 배지 조성을 결정하였다.

기타 첨가물로는 NaCl , Na_2CO_3 , CaCl_2 , CaCO_3 등의 일반적인 염들과 해양생태계에 존재하는 여러 가지 2가 양이온들을 사용하였으며 또한 효모 추출물, 아미노산 등도 첨가하여 그 효과를 살펴보았다. 특이한 사항은 Ca^{2+} 이온이 첨가될 경우 효소의 안정도가 높아져 전체 생산성도 향상됨을 확인할 수 있었고 이는 일반적인 효소 안정화제로 Ca^{2+} 이온을 사용하는 것과 같은 맥락에서 이해할 수 있을 것이다. 또한 몇 가지 아미노산을 첨가할 경우 효소생산성의 증가를 확인할 수 있었는데 특히 히스티딘을 첨가했을 경우 2배 정도의 역가향상을 나타냈고 이는 다른 종의 비브리오 균주에서 확인되었던 기존의 결과(J.Gen.Microbiol., 127, 193-199, 1981)와도 일치하는 것이다.

다. 물리적 요인들의 최적화

균주의 성장에 영향을 주는 요소는 영양소 뿐만 아니라 여러 가지 물리적 요소들도 있는데 그 대표적인 요소들이 pH, 온도, 산소량 등이다. 이중 pH는 앞에서도 언급한 바와 같이 해양성 미생물인 비브리오 균주의 생리적 상태를 결정하는 아주 중요한 요소로서 본 발명에서는 초기 균주 접종 배지에서의 pH, 연속배양 배지에서의 pH, 그리고 계대배양 배지에서의 pH를 각각 결정하였다. 또한, 균주의 배양 온도를 결정하는 실험에서는 모주인 비브리오 메쉬니코우비 알에이취 530 균주와 물연변이주인 비브리오 메쉬니코우비 알에이취 530 엔-4-8 균주에서 성장이 가장 왕성한 온도와 알칼리 단백질 분해효소를 가장 많이 생산하는 최적온도를 각각 구하였으며 그 온도가 비교적 중온인 30℃로 거의 모두 일치하였으므로 균의 배양온도를 30℃로 고정하였다.

한편, 배지내의 산소량은 균의 성장과 효소 생산에 영향을 미치는 아주 중요한 요소인데, 특히 비브리오 메쉬니코우비 알에이취 530 엔-4-8 균주는 혐성형기성 균주로서 투입되는 공기량에 매우 민감한 반응을 보였다. 특히, 플라스크 수준에서의 균주 배양은 물론이고 발효조에서의 대량 배양에도 투입되는 산소량이 너무 많으면 알칼리 단백질 분해효소의 생산성이 현저히 줄어들고, 또 투입되는 산소량이 너무 적으면 균주가 잘 자라지 못했다. 따라서, 배지내로의 적절한 산소투입량을 실험하였고 투입된 산소가 배지내로 잘 확산될 수 있는 조건도 같이 결정하였다.

위와 같은 여러 가지 물리적 요인들은 플라스크 수준에서의 조건과 대량생산을 위한 발효조에서의 조건에 약간의 차이를 보인다. 따라서, 본 발명에서는 플라스크와 발효조의 각각의 경우를 실험하였고 이의 결과는 하기 실시예에 자세히 기재된다.

라. 배지원료의 여러 가지 처리에 의한 생산성 증가

본 발명에서 실험한 많은 질소원들 중에는 분말형태의 원료들이 많다. 이들은 그 입도가 크거나 물에 용해도가 낮아서 실질적으로 균이 사용하기에는 어려운 점이 많은데 그 이유는 표면적의 감소와 용해성 질소원의 공급이 어렵기 때문이다. 따라서, 이 원료들을 미리 가공하여 영양분의 사용효율을 극대화하고 따라서 단백질 분해효소 생산을 늘리는 연구를 수행하였다.

원료들의 가공에는 여러 가지 방법을 사용하였는데 첫 번째로 분쇄방법을 사용하였다. 즉, 분말이나 박의 형태로 되어있는 원료들을 더욱 미세하게 분쇄하여 사용하였다. 두 번째로 추출방법을 사용하였다. 용해되지 않는 분말 원료들을 고농도로 물이나 배지 성분에 넣고 가온하거나 계속 혼합하여 수용성 질소원을 추출하여 사용하였다. 세 번째로 원료들에 효소처리를 하여 그 조직을 이완시키고 균주의 이용에 유리한 저분자 물질로 전환하는 방법을 사용하였다. 이때 사용한 효소로는 단백질 분해효소를 사용하였으며 효소 처리가 끝난 이후에는 효소 활성 저해제를 첨가하거나 가온하여 효소의 활성을 제거하였다.

위와 같은 세 가지 방법을 사용하여 원료를 가공했을 때 모든 경우에서 균주의 효소생산성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 그 중 가장 증가율이 높은 것은 효소를 이용하여 원료를 가공한 세 번째 방법이었다. 특히 세 번째 방법에서 NOVO사의 사비나제를 사용한 것보다 본 균주에서 생산된 단백질 분해효소를 사용한 경우가 동일조건에서 더 효과가 좋은 것으로 밝혀졌다.

요컨대, 본 발명에 따른 균주로부터 단백질 분해효소를 생성하는데 있어서 균주의 최적 배양조건 및 배지조성은 다음과 같다:

1. 성장온도의 범위가 20~38℃ 이고, 특히 28~32℃
2. 배양중 배지내로 투입되는 공기량이 0.1~1vvm이고, 특히 0.4~0.5 vvm
3. 배양중 교반속도가 200~1000rpm 이며, 특히 400~500rpm

4. 배지의 pH가 7~11이며, 특히 pH 8~9 정도인 약알칼리 조건
5. 배지의 염도(Na^+ 이온의 농도)가 0~5%이며, 특히 0.4~0.8%의 염도
6. 균주 배양의 주된 영양소중 질소원을 사용할 경우 무기질소원으로 암모늄 이온을 사용
7. 균주 배양의 주된 영양소중 질소원을 사용할 경우 유기질소원으로 SBM, CGM, WGM, TE, CSL을 사용
8. SBM, CGM, WGM의 원료함량이 각각 0~10 중량%이며, 특히 2~3 중량%
9. 상기 유기질소원 각각의 원료들을 혼합하여 사용하며, 특히 WGM과 CGM을 함께 사용
10. WGM과 CGM 각각의 사용량이 3중량%를 넘지 않고 또한 총 사용량이 전 배지 조성의 6중량%를 넘지 않으며, 특히 WGM 2중량%와 CGM 1중량%를 혼합하여 사용
11. 분말원료들을 분쇄, 추출, 효소처리들을 통하여 가공한 후 배지를 조성하며, 특히 효소처리한 후 사용

본 발명은 이하 실시예를 통해 구체적으로 예시한다.

실시예 1

일반적 방법에 의한 인공 돌연변이

우선 세포가 95% 이상 사멸되는 조건인 $12.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 NTG를 배양액 100ml의 세포에 5분간 처리하여 30°C 에서 진탕배양하였다. 이후, 세포를 두 번 세척하여 잔존하는 NTG를 완전히 제거한 후 LSC 배지 2ml에 녹여 이를 LSC 한천 배지에 도말한 후 30°C 에서 하룻밤 배양하여 얻은 콜로니를 LSC-탈지밀크 한천(pH 10.5)에 도말하여 역가가 높은 균주를 선별하였다(표2). 이 인공돌연변이 조건하에서 성장이 빠르거나(G2-31), 특이적 활성이 비교적 높은 균주(G2-31-4-1, L12-15)를 얻어 이를 다시 2차, 3차 돌연변이 처리하여 역가가 높은 균주를 선별하고자 하였다. 그러나, 본 방법으로는 모두 보다 매우 높은 생산성 항상 균주를 확보하지 못하였다.

[표 2]

돌연변이의 선별

균주	성장	pH		활성
	(O.D. $_{600\text{nm}}$)	(초기 pH)	(최종 pH)	(units/mg/ml)
브이. 메쉬니코우이	4.71	10.5	9.41	506
알에이취 530				
G2	4.52	10.5	9.38	532
G2-31	5.15	10.5	9.38	526
G2-31-4	4.33	10.5	9.41	490
G2-31-4-1	4.58	10.5	9.36	532
L12-15	4.77	10.5	9.41	535
L12-11	4.66	10.5	9.43	518
L12-19	4.39	10.5	9.44	516

[표 3]

돌연변이의 선별

균주	성장	pH		활성
	(O.D. $_{600\text{nm}}$)	(초기 pH)	(최종 pH)	(units/mg/ml)
브이. 메쉬니코우이 알에이취 530	4.75	10.5	9.61	502
No. 1	4.76	10.5	9.55	536
No. 8	4.78	10.5	9.55	534
No. 11	4.66	10.5	9.52	532
No. 15	4.63	10.5	9.46	522
No. 19	4.66	10.5	9.53	506
No. 23	4.58	10.5	9.55	536

실시예 2

계면활성제에 내성이 있거나 높은 민감성이 있는 돌연변이 균주로부터 고역가 균주선별

NTG 처리에 의한 무작위적인 균주의 선별은 많은 시간과 노력을 투자해야 하는 단점이 대두되어 본 발명에서는 독창적인 방법을 고안하였다. 즉 계면활성제인 AOS나 LAS에 내성이 있거나 높은 민감성이 있는 균주를 선별하였다. 하기 표4에서 보듯이 AOS는, 균주의 성장에 어떠한 영향도 끼치지 않으므로 본 발명에서는 LAS에 대한 저항성이나 민감한 돌연변이주를 선별하기 위해 상기 표2의 균주들을 3~4차례 계대 배양하여 비교적 안정하게 높은 역가를 보이는 균주 L12-15를 2차 균주 개량의 대상으로 선정하였다.

L12-15의 LAS에 대한 성장 감수성(표5)을 보면 LSC 한천 배지에서 0.4%까지는 성장이고 0.5% 이상에서는 균이 사멸되므로 LAS에 대한 내성주 선별은 0.5%, 0.6%에서 주로 선별하였고, LAS에 대한 민감성 균주 선별은 최하 0.2%까지 자라지 못하는 균주를 선별하였다. 그 결과 LAS 0.5%에 내성을 보이는 균주를 50주, 0.6%에 내성을 보이는 균주 40주를 선정하여 LSC 육즙에서 그 역가를 측정하였다. 그 결과 대부분 50주 보다 역가가 감소되었고, 오히려 50여주의 민감성 균주에서 약 2배 정도의 생산성 향상 균주(표6, 도1)를 찾을 수 있었으며 수 차례의 계대 배양시에도 안정하게 그 활성이 유지됨을 알 수 있었다.

[표 4]

AOS가 돌연변이 성장(배지 표면상에서의 성장)에 미치는 영향

균주	AOS의 농도(%)			
	0.5	1	2	3
브이. 메쉬니코우이 알에이취 530	+++	++	++	+
G2	+++	++	++	+
G2-31	+++	++	++	+

[표 5]

LAS가 돌연변이의 성장(배지 표면상에서의 성장)에 미치는 영향

균주	LAS의 농도(%)					
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	1
브이. 메쉬니코우이 알에이취 530	++	++	+	+	-	-
G2-31-4	++	++	+	-	-	-
G2-31-4-1-8	++	++	-	-	-	-
L12-11	++	++	+	+	-	-
L12-15	++	++	+	+	+	-
L12-19	++	++	+	+	-	-
L12-23	++	++	+	+	-	-

[표 6]

프로테아제 과다생산성 돌연변이의 선별

균주	성장	pH		활성
	(O.D. 600nm)	(초기 pH)	(최종 pH)	(units/mg/ml)
브이. 메쉬니코우이 알에이취 530	4.71	10.5	9.41	526
N	4.31	10.5	9.24	749
N-4	4.47	10.5	9.30	762
N-4-1	4.7	10.5	9.50	999
N-4-8	5.73	10.5	9.27	1085

실시예 3

최적 pH 결정

본 실시예는 비브리오 균주가 해양성 미생물로서 알칼리 조건에서도 성장이 우수함에 착안하였다. 배지의 기본 조성은 트립톤 1%, 효모추출액 0.5%, NaCl 0.5%로 하였으며 배양 조건은 30℃에서 200rpm의 속도로 24시간 교반 배양하였다. 실험 균주는 모균주인 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530을 사용했으며 조사한 pH 범위는 중성인 pH 7에서 강알칼리성인 pH 10까지 하였다. 그 결과는 아래의 표7과 같다.

[표 7]

pH	균의 성장도 (OD _{560nm})	효소 역가
7	11.1	245
8	10.8	254
9	10.9	248
10	9.8	231

위의 표에서 볼 수 있듯이 비브리오 균주는 강알칼리 조건에서도 그 성장과 효소생산이 우수함을 알 수 있으나, 최적의 조건은 약알칼리성인 pH 8~9 정도임을 확인할 수 있었다. 위의 결과는 돌연변이 주를 사용하여 실험한 경우에서도 재현되었으며, 다른 생산배지 원료를 사용하여 균주를 배양했을 때도 동일한 양상을 보였다.

실시예 4

최적 염분 농도의 결정

본 실시예는 비브리오 균주가 해양성 미생물로서 그 성장에 Na⁺ 이온이 반드시 필요함에 착안하였다. 배양조건과 배지의 기본 조성은 실시예 1과 동일하며 균주는 모균주인 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530을 사용하였다. 염분의 농도는 0% 에서 5%까지 조사하였고 pH 는 실시예 1에서 결정한 바와 같이 약알칼리 조건인 pH 8로 조절하였다. 그 결과는 아래의 표8과 같다.

[표 8]

NaCl의 농도 (%)	균의 성장도 (OD _{560nm})	효소 역가
0	5.7	5
0.2	12.7	210
0.4	11.6	236
0.6	11.5	254
0.8	11.5	252
1.0	11.2	240

위의 표에서 볼 수 있듯이 염분이 함유되지 않은 배지에서는 균의 성장이 거의 이루어지지 않았으며, 추가로 1% 이상의 고염분 배지에서도 균의 성장이 많이 저해된 것으로 밝혀졌다. 균주가 가장 최적의 성장을 보이는 염분농도는 0.2%였고 효소생산이 가장 높은 염분농도는 0.4 내지 0.8%였다.

실시예 5

무기질소원의 영향 조사

본 실시예는 무기질소원을 사용하여 균주 배양을 하였는데 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530 균주는 NO₃⁻를 NO₂⁻로 환원시켜 이용하지 못하기 때문에 암모늄 이온만을 조사하였다. 배양조건은 실시예 1과 동일하며 배지조성도 실시예 1과 2에서 정한 것을 기본으로 하여 암모늄 이온을 첨가한 대조군과 비교하였고 균주는 모균주인 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530을 사용하였다. 이때 암모늄 이온의 공급원으로는 NH₄Cl을 사용하였으며 그 결과는 아래의 표9와 같다.

[표 9]

NH ₄ Cl 농도 (%)	균의 성장도 (OD _{560nm})	효소 역가
0	10.8	248
0.2	10.4	256
1.0	11.1	275

위의 표에서 볼 수 있듯이 무기질소원인 암모늄 이온이 첨가되면 균의 성장과 효소역가가 함께 상승하는 형태를 나타내는데 이는 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530 균주의 효소생산이 그 성장과 밀접한 상관 관계를 맺고 있음을 다시 한번 보여준다. 또한, 효소 생산성을 높이기 위해서는 질소원의 공급이 필요함도 알 수 있다.

실시예 6

유기질소원의 영향 조사

본 실시예에서는 유기질소원을 사용하여 균주 배양을 하였는데, 일차적으로 모균주인 비브리오 메쉬니코

우이 알에이취 530 균주로 실험을 하고 동일한 과정을 돌연변이 균주인 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530 엔-4-8 에도 똑같이 적용해보았다. 실시예 3과 4에서 결정한 조건을 적용하여 배지를 만들었으며 그 조성은 효모 추출액 0.5%, NaCl 0.5%에 각각의 유기질소원들 2%, 5% 씩 넣고 pH 8로 보정하여 사용 하였다. 또한, 균주의 배양시간을 24시간에서 48시간으로 늘려 충분한 효과를 관찰하였다. 그 결과는 아래의 표10 및 표11과 같다. 각각의 약자는 다음과 같다: SBM: 대두밀; CGM: 옥수수 글루텐 밀; WGM: 소맥 글루텐 밀; TE: 투나 추출물; CSL: 옥수수 침지액)

[표 10]

<유기질소원 2% 사용할 때의 효소역가>

	SBM	CGM	WGM	TE	CSL
24 시간	783	627	794	230	246
48 시간	964	1006	1152	222	192

[표 11]

<유기질소원 5% 사용할 때의 효소역가>

	SBM	CGM	WGM	TE	CSL
24 시간	554	66	418	404	174
48 시간	936	708	928	426	302

위의 표에서 볼 때 역가 항상 돌연변이 균주인 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530 N-4-8의 배양에 가장 좋은 유기질소원은 WGM임을 알 수 있으며 TE와 CSL은 다른 원료들에 비해 현저히 효소역가가 낮음을 볼 수 있다. 또한, 특이한 사항은 SBM, CGM, WGM 에서 나타나는 고농도에서의 효소역가 저해현상으로 본 균주가 과영양상태에서는 효소생성 효율이 떨어지는 것을 알 수 있다. 따라서, 이들 세 가지 원료에 대하여 가장 최적의 효소역가를 보이는 배지조성 농도를 잡기 위한 실험을 실시하였으며 그 결과 각각의 원료들이 2 내지 3% 정도에서 최적 농도를 나타냄을 알 수 있었다.

실시예 7

원료들의 혼합비율 결정

본 실시예는 실시예 6에서 밝힌 결과를 토대로 하여 가장 최적의 원료 혼합비율을 결정하는 실험을 실시 하였다. 실시예 6의결과를 볼 때 균주의 배양에는 SBM, CGM, WGM의 원료가 다른 원료들에 비해 그 효과가 우수하고 각각의 원료 사용량은 2~3%가 최적임을 알 수 있었다. 따라서, 이들 원료의 사용량이 3%가 넘지 않는 범위에서 각각을 혼합하여 가장 우수한 배합 비율 찾고자 하였다.

실험에 사용한 배지 조성은 실시예 6의 경우와 같으며 배양조건도 동일하나 배양시간은 72시간으로 더욱 늘렸다. 각각의 원료들을 2% 씩 동일 비율로 혼합한 배지에서 실험하였고, 사용 균주는 돌연변이주인 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530 엔-4-8을 사용하였다. 실험결과 효소역가는 다음 표12와 같다.

[표 12]

	SBM 2% + CGM 2%	CGM 2% + WGM 2%	WGM 2% + SBM 2%
24 시간	476	374	806
48 시간	984	1240	1158
72 시간	820	1292	1028

위의 표에서 볼 수 있듯이 가장 효소역가가 높게 나오는 최적의 원료배합은 CGM 과 WGM을 혼합한 것으로 다른 원료들의 조합보다 10~30% 정도의 역가 향상을 보인다. 그리고 배양시간은 48시간이 넘으면 효소 생산에 변화가 없거나 오히려 역가가 저하되므로 좋지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로 WGM 과 CGM의 최적 조합비율 찾는 실험을 실시하였고 그 결과는 다음 표13과 같다.

[표 13]

	WGM 2% + CGM 0%	WGM 2% + CGM 1%	WGM 2% + CGM 2%
24 시간	577	559	433
48 시간	852	942	902

위의 표에서 알 수 있듯이 원료들의 총 배합비가 3% 이상이 되면 오히려 효소생산에 저해현상이 나타나고, 또한 단독으로 사용한 경우보다 혼합배지에서의 역가가 더 높다. 따라서, 최적의 배합 비로는 WGM 2% 에 CGM 1%를 섞은 것으로 결정하였다.

실시예 8

산소 투입량의 결정

본 실시예는 실시예 7에서 결정한 최적 생산배지를 이용하여 투입하는 산소량을 조절하며 효소생산성을 살펴보았다. 산소량을 조절하기 위해서 발효조를 사용했으며 배지조성은 앞의 실시예 6과 동일하며 배양 조건은 30℃, pH 8, 800rpm 에서 결정하였다. 비교조건은 투입산소량을 1 vvm 과 0.5 vvm 의 두 가지로

하였으며 돌연변이주인 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530 엔-4-8을 사용하였고 그 실험 결과는 다음 표 14와 같다.

[표 14]

산소량	1 vvm	0.5 vvm
시 간		
12 시간	484	509
24 시간	751	879

위의 표에서 볼 수 있듯이 통상혐기성인 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530 N-4-8 균주는 투입되는 산소량이 과다할 경우 효소생성에 저해를 받는다. 물론 투입되는 산소량이 너무 적으면 성장자체가 현저히 저하됨을 확인할 수 있었다. 따라서, 위의 실험으로 미루어 투입 산소량은 0.5 vvm으로 결정하였으며 다음으로는 배지전체로 산소가 골고루 혼합될 수 있는 교반의 정도를 알아보는 실험을 하였다. 그 결과는 다음 표 15와 같다.

[표 15]

	300 rpm	400 rpm	500 rpm	800 rpm
12 시간	67	558	532	562
24 시간	658	1079	938	892

위의 표에서 알 수 있듯이 발효조에서의 교반속도도 균주의 효소생성에 많은 영향을 미치고 있었는데 특히 일정속도 이하의 교반상태에서는 균주성장과 효소생성이 심하게 저하됨을 알 수 있었고 또한 일정속도 이상의 교반상태에서는 그 속도가 증가함에 따라 점차적인 효소역가 저하현상이 나타났다. 이 결과로 볼 때 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530 엔-4-8 균주는 산소량에 매우 민감함을 알 수 있으며 대량생산에 필요한 발효조에서의 조건은 본 실시예 8에서 얻은 결과인 투입공기량 0.5 vvm, 교반속도 400 rpm을 적용하였다.

실시예 9

분말원료의 효소처리에 의한 생산성 향상 실험

본 실시예는 실시예 7에서 우수한 효소역가를 나타내는 원료로 확인된 SBM, CGM, WGM을 이용한 실험으로 상기 원료들은 모두 분말형태이며 물에 녹지 않는 특성을 지녔다. 따라서, 균주가 성장에 이용하기 좋은 형태로 만들기 위해 단백질 분해효소를 처리하였으며 이때 사용한 단백질 분해효소는 NOVO 사의 사비나제와 본 균주로부터 생산되는 단백질 분해효소를 사용하였다. 배지의 기본 조성은 실시예 7 과 같으며 각각의 원료를 2% 씩 첨가하였고 배양조건과 배양시간은 실시예 3과 같이 하였다. 이때 사용한 본 균주의 효소는 24시간동안 배양한 배양액을 그대로 사용한 것이고 사비나제와 함께 중량 비로 2% 넣어 pH 10, 40℃ 조건에서 30분간 반응시켰다. 그 실험 결과는 다음 표 16과 같다.

[표 16]

	대조군	사비나제 처리	본 균주의 효소처리
SBM	369	388	398
CGM	323	345	361
WGM	395	448	470

위의 표에서 알 수 있듯이 모든 분말 원료에서 단백질 분해효소를 처리할 경우 효소 생산성이 10 내지 20%까지 상승함을 알 수 있다. 또한 기존에 판매되고 있는 NOVO사의 사비나제를 사용했을 때 보다 본 균주에서 생성된 효소를 처리했을 경우 역가가 더 높음을 알 수 있다. 이러한 결과는 돌연변이 균주를 이용한 실험에서도 재연되었으며 실시예 7에서 결정된 WGM 과 CGM의 혼합원료를 사용한 실험에서도 같은 양상을 보였다.

발명의 효과

이상의 결과로부터 본 발명은 세탁세제용 단백질분해효소를 대량생산하는데 산업적으로 유용할 수 있음이 명백하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

LAS에 높은 민감성을 보이며 단백질 분해효소의 활성이 높은 균주 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530 엔-4-8(KFCC-11030, 기탁일 98년 4월 23일).

청구항 2

균주 비브리오 메쉬니코우이 알에이취 530 엔-4-8을 하기의 조건하에서 배양하고 배양물로부터 단백질 분해효소를 분리함을 특징으로 하여, 상기 단백질 분해효소를 제조하는 방법:

온도: 20 내지 38℃

용기량: 0.1 내지 1 vvm

교반속도: 200 내지 1,000rpm

배지 pH: 7 내지 11

배지 염도(Na^+ 이온의 농도): 0 내지 5%

무기질소원: 암모늄 이온

유기질소원: 10중량% 이하의 SBM, CGM 또는 WGM.

도면

도면1

